

Detección de *Ehrlichia canis* en Perro-Zorro (*Cerdocyon thous*) del municipio de Pereira, Risaralda, 2017

Detection of *Ehrlichia canis* in Perro-Zorro (*Cerdocyon thous*) of the municipality of Pereira, Risaralda, 2017

Jonathan Céspedes López¹, Juan Carlos Rincón florez²

¹ Estudiante de Medicina Veterinaria y zootecnia. Facultad de Ciencias de la salud. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. ² Docente de Medicina Veterinaria y zootecnia. Facultad de Ciencias de la salud. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

Resumen

Pereira es una ciudad que posee diferentes tipos de ecosistemas y cuenta principalmente con pastizales, hábitat y hogar de múltiples especies de animales silvestres que interactúan en busca de alimento, siendo estos vulnerables a cambios que se le realice en su hábitat. La ciudad de Pereira y sus diferentes ecosistemas sirve como lugar de interacción entre el zorro-perro (*cerdocyon thous*) y el perro doméstico (*cannis familiaris*), permitiendo además tener contacto con humanos que los alimentan. El contacto entre estos canidos constituye un factor de riesgo para la diseminación de enfermedades e introducción de estas entre el medio silvestre y las poblaciones urbanas, poniendo en peligro a diferentes especies, incluyendo al humano. Una de las enfermedades que puede estar presente entre ambas especies es la *Erlichiosis*, la cual es transmitida por diferentes vectores donde el más importante es el *Rhipicephalus Sanguineus*, aunque poco conocida la presencia de este hemoparásito en los zorros de Colombia, se han encontrado algunos casos en Brasil identificados por medio de PCR. Para este trabajo se tuvieron en cuenta 5 muestras de perro zorro localizados en la ciudad de Pereira, se incluyeron en el

estudio los animales que se hallaban en cautiverio en el Bioparque Ukumarí y los animales que se encontraban en el hogar de paso para el cuidado de fauna silvestre incautada por la corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER). El objetivo fue estandarizar una técnica de PCR y determinar la presencia y frecuencia de *Ehrlichia canis* en el perro zorro (*Cerdocyon Thous*) del municipio de Pereira. Se pudo estandarizar una PCR y los resultados indicaron que ninguno de los zorros muestreados eran positivos a *Ehrlichia spp*, aunque uno de ellos había sido positivo en la prueba por SNAP. Para concluir, es importante seguir realizando estudios que permitan enriquecer el conocimiento sobre el estado de las poblaciones de animales silvestres que en cierto modo resultan teniendo interacción con animales domésticos y humanos, pues la ausencia de *Ehrlichia spp* en este estudio no asegura que otros individuos puedan ser positivos a dicho patógeno.

Palabras Clave: *Cerdocyon thous*, Ehrlichiosis, Garrapatas, Rickettsia, Trombocitopenia.

Abstract

Pereira is a city that has different types of ecosystems and has mainly grasslands, this is a habitat and home to multiple species of wild animals that interact in search of food, being vulnerable to changes made in this one. The city of Pereira has different ecosystems serves as a place of interaction between the fox-dog (*pigcyon thous*) and the domestic dog (*cannis familiaris*), also allowing contact with humans who feed them. The contact between these canids constitutes a risk factor for the dissemination of diseases and their introduction between the wild and urban populations, endangering different species, including humans. One of the diseases that is present between both species is Erlichiosis, which is transmitted by different vectors where the most important is the Riphicephalus Sanguineus, although little known the presence of this hemoparasite in the foxes of Colombia, some cases have been found in Brazil identified by means of PCR. For this work, 5 fox dog samples located in the city of Pereira were taken into account. The animals that were in

captivity in the Ukumarí Biopark and the animals that were in the home of passage for the care of the animals were included in the study. Wildlife seized by the Regional Autonomous Corporation of Risaralda (CARDER). The objective was to standardize a PCR technique and determine the presence and frequency of *Ehrlichia canis* in the fox dog (*Cerdocyon Thous*) of the municipality of Pereira. A PCR could be standardized and the results indicated that none of the foxes were positive for *Ehrlichia* spp, although one of them had positive in the SNAP test. To conclude, it is important to continue conducting studies to enrich the knowledge about the status of wild animal populations that in some way result in interaction with domestic and human animals, since the absence of *Ehrlichia* spp in this study does not guarantee that other individuals can be positive to said pathogen.

Key words: *Cerdocyon thous*, Ehrlichiosis, Ticks, Rickettsia, Thrombocytopenia.

Introducción

La ciudad de Pereira cuenta con una gran cantidad de zonas boscosas al interior y cerca del centro urbano, en estas zonas se encuentran múltiples especies de animales silvestres, entre ellos el zorro-perro (*cerdocyon thous*), que frecuentemente interacciona con la población de perros domésticos (*cannis familiaris*) (1), además, tienen contacto con humanos que los alimentan, dicho contacto constituye un factor de riesgo para la diseminación de enfermedades y la introducción de estas al medio silvestre o la propagación del medio silvestre a las poblaciones urbanas.

Una de las enfermedades más peligrosas en caninos es la Erlichiosis que involucra diferentes vectores donde el más importante es el *Rhiphicephalus Sanguineus* (2), teniendo en cuenta que tanto el zorro-perro y perro doméstico son caninos, podrían compartir tanto parásitos comunes, como la susceptibilidad y presencia de la enfermedad, en este caso el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) al tener interacción con el zorro-perro (*Cerdocyon thous*) le puede transmitir enfermedades como la ehrlichiosis, esta puede ser totalmente patógena y transmisible, pues las dos especies son cercanas evolutivamente (3), sin embargo, actualmente se

desconoce si hay presencia de esta enfermedad en el zorro-perro en la ciudad de Pereira.

El crecimiento poblacional humano ha hecho que el hábitat del zorro se haya delimitado a la civilización, de esta manera el acercamiento entre el perro doméstico y el zorro-perro se convierte en la necesidad de interactuar en búsqueda de alimento, ya sean desperdicios o presas salvajes (1); al ser canidos comparten las mismas enfermedades y es necesario saber hasta qué punto estas enfermedades han sido transmitidas de los perros domésticos a los zorros, por ende, es de suma importancia conocer los patógenos que afectan a las poblaciones de zorros en Pereira para poder establecer las medidas y cuidados necesarios en búsqueda de evitar la extinción de estas poblaciones.

El principal capital biológico del mundo es la fauna silvestre y sus respectivas especies son parte fundamental del área que habitan, pues en su forma de vida, ayudan de manera directa al equilibrio ecológico de estos ecosistemas, es por esto que la desaparición repentina de cualquier especie en su habitat, genera desequilibrio, la relación cazador-presa se puede ver alterada al punto de tener problemas con especies que se convierten en plaga. En este sentido la biodiversidad del país debe ser destacada y conservada de manera prioritaria, pues hace parte del patrimonio nacional, es de gran interés de la humanidad y mantiene el equilibrio ecológico (4).

El perro-zorro (*cerdocyon thous*) es primordial en los bosques y pastizales que habita, pues es un gran contribuyente en estos ecosistemas, al dispersar una gran variedad de semillas de plantas silvestres por medio de sus excrementos, de igual manera es depredador de varias especies de insectos y pequeños mamíferos, permitiendo un equilibrio en dichos ecosistemas (5). Actualmente se ha descrito el primer caso de *ehrlichia* en zorros en Brasil, estos animales se encontraron muertos en las carreteras a los cuales se les tomó muestra de bazo, pulmón y sangre, por medio de un PCR que iba dirigida a los géneros , *boreelia*, *rickettsia*, *ehrlichia*, *coxiella* y *anaplasma*, se encontró que estos zorros eran positivos a *ehrlichia* y *hepatozoon* (6), de esto surge la necesidad de estudiar a fondo esta especie,

teniendo en cuenta que es susceptible a las mismas enfermedades que poseen los canidos domésticos.

El perro zorro (*Cerdocyon thous*) es un mamífero de tamaño medio, de la familia de los canidos y perteneciente a los zorros, pesa aproximadamente de 5-7 Kg, tiene cola espesa de color negro en la punta y el resto de la base es oscuro, su rostro es largo y puntiagudo, tiene pelaje que varía de gris oscuro a negro en la línea dorsal y en su vientre posee variabilidad de colores y tonalidades entre el amarillo, negro y gris (5); Este canido se encuentra distribuido en diferentes tipos de hábitats, que incluyen sabanas, bosques tropicales y subtropicales, bosques abiertos, pastizales y zonas antrópicas que comprometen a Colombia, Venezuela, Paraguay, al norte de argentina, Uruguay y en todo Brasil exceptuando las tierras bajas del amazonas (7). El *Cerdocyon thous* tiene su principal actividad crepuscular y nocturna, se alimenta de algunas frutas y vertebrados como cangrejos e insectos, además, cuando tienen contacto con las zonas urbanas consumen todo tipo de desperdicio humano (6).

El perro doméstico (*canis lupus familiaris*) es considerado a nivel mundial una de las especies de vertebrados más invasoras del mundo, en Colombia se tenía estimada una población de 4.150.374 perros, siendo la mayor cantidad de ellos pertenecientes a la fauna callejera (8,9). El pastizal es el medio silvestre más frecuentado por el perro-zorro (*Cerdocyon thous*) y el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) siendo este el principal medio de interacción entre las dos especies, además la intervención humana en los diferentes ecosistemas y sus residuos orgánicos en estos, hace que el acercamiento entre el zorro-perro y el perro domestico sea más grande, dejando a estos individuos como grandes competidores por los recursos de fácil acceso (1). Al ser estas dos especies de la familia *canidae*, tienen la característica de compartir genética, siendo un gran problema al convivir, pues las interacciones más comunes entre el perro (*Canis lupus familiaris*) y la fauna silvestre son la transmisión de enfermedades y la depredación. El perro al ser el principal portador de patógenos ha causado una disminución significativa de poblaciones nativas alrededor del mundo (10).

La infección de *E. canis* se describió primeramente en Brasil, siendo este un país tropical similar a Colombia, teniendo como principal portador la garrapata

Rhipicephalus sanguineus, especie catalogada como la principal garrapata infestante en canidos (11). La susceptibilidad de diferentes enfermedades transmitidas por estas garrapatas es muy alta en perros, principalmente las enfermedades que hacen parte de la familia *anaplasmataceae* en la cual se encuentran incluidos los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* y *Neorickettsia* (12). Estas enfermedades suelen producir diferentes sintomatologías clínicas como lo son problemas en el sistema locomotor, aumento en la temperatura, anorexias, malestar general, aunque en muchas situaciones no se presenta sintomatología clínica. A nivel microscópico se puede observar trombocitopenia, leucopenia e hiperproteïnemia, hipergammaglobulinemia (12).

La ehrlichiosis puede manifestarse en tres etapas, teniendo primeramente la parte aguda, seguida de la subclínica y por último la crónica, su patogenicidad se ve ligada a las diferentes cepas de *E. canis* que logran infectar el tejido animal (13). Un estudio realizado en Colombia por Vargas Hernández (14) muestra la presencia de *Ehrlichia canis* en perros, con una alta prevalencia siendo esta del 40.6% en ADN y 82.4% de anticuerpos a *E.canis*; aunque se sabe que en América del sur la *E.canis* es transmitida por la garrapata, solo se tiene confirmación molecular en Brasil. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue determinar la presencia molecular de *Ehrlichia canis* en perro-zorro (*Cerdocyon thous*) del municipio de Pereira, Risaralda 2017.

Materiales y Métodos

Para este trabajo se tuvieron en cuenta muestras de perro-zorro (*Cerdocyon thous*) localizados en la ciudad de Pereira, capital de Risaralda. Se incluyeron en el estudio animales que se encontraban muertos o accidentados en la carretera y las muestras fueron suministradas por la autoridad competente. También se incluyeron muestras de animales incautados que se encontraban en el hogar de paso para el cuidado de fauna silvestre de la corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER). En los casos de animales del hogar de paso se realizó restricción física con nasa y posterior restricción química con una combinación de xilacina a dosis de 1mg/kg y ketamina dosis de 10 mg/kg, vía intramuscular.

Las muestras tomadas fueron transportadas al laboratorio múltiple de Ciencias Animales de la Universidad Tecnológica de Pereira, donde fueron procesadas para la separación de los sueros, se extrajo el ADN de la sangre usando el kit comercial DNeasy Blood and tissue (Qiagen®), para evaluaciones posteriores. Para la separación de sueros se realizó una centrifugación a 4000g durante 5 minutos y se almacenaron las muestras en tubos Eppendorf debidamente rotulados. Todos los sueros fueron almacenados a -20°C en el laboratorio.

Para la amplificación por PCR se usaron los cebadores reportados por Almeida et al. (2013) (6), que permitieron amplificar un segmento de 349 pb del gen 16S, dsb de *Ehrlichia spp.* Los cebadores que se utilizaron fueron el Forward: 5'-ATTTTATAGRGATTTTCCAATACTTGG-3' y el Reverse: 5'-CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC-3'. La estandarización de la PCR tuvo como punto de partida el protocolo propuesto por este autor y se realizó a un volumen final de 25ul, con una concentración de 1X de buffer de PCR, 200uM de cada dNTP, 0.4 uM de cada cebador, 1U de enzima top Taq Polymerase (Qiagen®) y 1.5 mM de MgCl₂, completando hasta el volumen final con agua libre de DNasas. Se usaron 5ul de ADN con una concentración mínima de 15ng/ul. El perfil de temperaturas usado incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, para posteriormente repetir por 40 ciclos la desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido de una temperatura de alineamiento de 52°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 50 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 8 minutos. Como control positivo se usaron muestras de DNA positivas y previamente amplificadas en caninos domésticos y como control negativo se usaron muestras de agua o animales negativos. Una vez amplificadas, se realizó la identificación del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando EZ-Vision para la tinción. Se usó un marcador de peso molecular Low range de Fermentas para la identificación de las bandas de amplificación, se visualizaron y tomaron fotografías de los geles mediante un fotodocumentador.

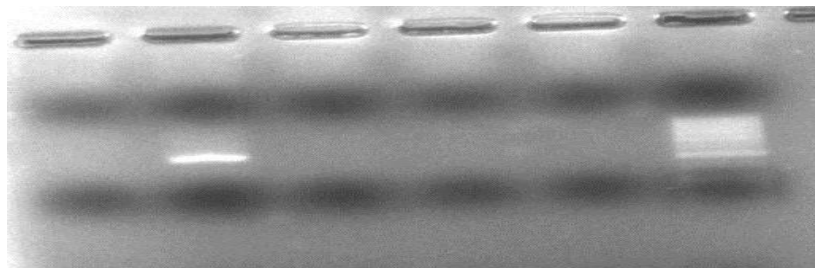
Finalmente, se usó la estadística descriptiva para la caracterización inicial de las variables tomadas. Las variables cualitativas fueron resumidas como proporciones (%), las frecuencias estuvieron presentadas con sus respectivos IC:95% mediante el software R (15).

Resultados

Se colectaron muestras sanguíneas de 5 perros zorros, de los cuales dos fueron incautados por la CARDER y se encontraban en el hogar de paso para la rehabilitación y posterior liberación. Estos animales estaban en buenas condiciones de salud, se muestreó otro zorro cuando fue llevado a una clínica veterinaria para ser atendido tras encontrarse atropellado en la carretera y las otras dos muestras correspondieron a animales que se encontraron enfermos y murieron posteriormente en el hogar de paso, de los cuales uno de ellos fue positivo a *Ehrlichia* mediante una prueba SNAP® 4DX® PLUS (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) que detecta anticuerpos para *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *E. canis* y *E. ewingii*.

A partir de las 5 muestras se pudo obtener satisfactoriamente ADN a una concentración promedio de $45\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 5$, dichas muestras fueron adecuadas para la prueba de PCR, la cual se estandarizó de manera exitosa (figura 1), pero no se encontró ningún zorro-perro (*Cerdocyon thous*) positivo a *Ehrlichia* spp., lo cual contrasta con el resultado previo del SNAP, lo que sugiere que posiblemente la infección detectada no fue causada por *Ehrlichia*. Teniendo en cuenta el número pequeño de la muestra, el intervalo de confianza del 95% para la prevalencia es muy amplio (0-53%) y no es significativo.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa, donde se pueden evidenciar los animales negativos. Carril 1: Control negativo, Carril 2: Control positivo, Carril 3-5: Muestras.



Discusión

La *Ehrlichia spp.* es una bacteria intracelular transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, dicha bacteria produce Ehrlichiosis, una enfermedad rickettsial registrada por primera vez en el año 1935 y desde entonces ha tenido gran distribución en todo mundo, incluyendo los países sudamericanos (25). El *Rhipicephalus sanguineus* actúa como portador de *Ehrlichia sp.*, por lo que aún falta hacer estudios a fondo para identificar si el vector es igual en poblaciones naturales o se presentan algún otro adicional. Entre el año 2004 y 2005 la Corporación Autónoma Regional del Quindío realizó un estudio que buscaba ectoparásitos en mamíferos incautados y otros entregados a la entidad, dicho estudio arrojó la presencia de *Ctenocephalides felis*, *Pulex sp*, *Ixodes sp* y *Rhipicephalus sanguineus* (portadora de Ehrlichia) en *Cerdocyon thous* (26).

En este estudio se determinó la ausencia de *Ehrlichia spp.* por medio de PCR en zorro-perro (*Cerdocyon thous*) de la ciudad de Pereira, Risaralda. Hasta el momento no se reporta la presencia de *Ehrlichia spp.* en zorro-perro (*Cerdocyon thous*) en Colombia, teniendo en cuenta que Brasil realizó el primer reporte en *Cerdocyon thous*, donde se tomaron muestras de tejido pertenecientes a 58 zorros encontrados atropellados en la carretera, dichas muestras indicaron que 6 de los 58 zorros eran positivos a *Ehrlichia sp.* (6), lo cual muestra que la prevalencia es baja (10.3%), por ese motivo y considerando la poca cantidad de animales muestreados en este trabajo, es posible que por azar no se haya encontrado ninguno afectado.

La prueba SNAP® 4DX® PLUS presenta una especificidad cercana al 100% y sensibilidad de 98,9% (16), indicando que posiblemente identificó anticuerpos de otro parásito distinto a *Ehrlichia spp.* Un estudio realizado en Israel con sangre entera de perro, permitió determinar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia minasensis* por medio de PCR, dicho estudio denotó que con un intervalo de confianza del 95% que la sensibilidad y especificidad de las pruebas TaqMan y la PCRun® eran del 100% absolutas, en todas las muestras analizadas (17). Por otro lado, es importante tener en cuenta que la identificación del parásito también puede depender de su evolución en el organismo, pues un estudio realizado en el sureste

de Ohio analizó el estado de un paciente que presentaba cuadro clínico con anemia leve, monocitosis, neutrofilia madura, entre otros. Dicho estudio reveló que la era negativa la presencia de *Ehrlichia spp.* por medio de títulos iniciales y convencionales, pero luego se verificó la presencia de *Ehrlichia ewingii* por medio de PCR. Después de ser tratado el paciente se realiza de nuevo la PCR a los 18 días y 3 años posteriores, denotando la ausencia del patógeno en el paciente (18), mientras que en el caso de los anticuerpos se seguirían presentando y las pruebas serológicas serán positivas.

Por otro lado, resulta importante tener en cuenta que la identificación del patógeno se puede realizar por medio de diferentes muestras tomadas del organismo, en este caso se describe la presencia de *Ehrlichia ewingii* en la médula ósea de una paciente con 65 años de edad, además se identificó que la paciente tenía múltiples picaduras de garrapatas, identificando por medio de frotis periférico y biopsia de médula la presencia de *E. ewingii*, además se reconfirma por medio de PCR en ambas muestras (19). Además se puede identificar su presencia también en muestra de sangre periférica, aspirados de fluidos y tejidos corporales como lo es el sinovial y el LCR, denotando que la evaluación es más evidente en fase aguda (Primeras semanas) (20).

En relación a otros hallazgos, un estudio realizado por Zohar Fishman et al, en Koret School of Veterinary Medicine en Israel, mostró la presencia de *E. canis* en 30 de 84 zorros rojos (*Vulpes vulpes*) muestreados, además la interacción de estos con los humanos y los perros domésticos, considerando un reservorio de enfermedades zoonóticas y veterinarias (21). En Suiza se realizó un estudio por Nicola Pusterla et al, donde se hizo uso de 1,550 zorros rojos (*Vulpes vulpes*) que fueron sacrificados en temporada de caza, en un periodo que iba desde 1989 hasta 1998, se tomaron muestras de sangre coagulada que fueron recogidas del corazón y líquido de la cavidad pleural, dichas muestras se clasificaron respecto a su lugar de recolección en Suiza y en los resultados se evidenció la ausencia de *E. canis* en las muestras obtenidas, pero se encontró la presencia de *Ehrlichia phagocytophila* (actualmente *Anaplasma phagocytophila*), un total de 44 (2,8%) muestras tenían anticuerpos para *E. phagocytophila* con prevalencias diferentes respecto a su ubicación en Suiza (22).

En Colombia se identificó el primer caso de ehrlichiosis monocítica humana en un soldado de 19 años el cual habitaba la ciudad de Quibdó, se le realizaron distintas pruebas para descartar enfermedades comunes, pues su cuadro clínico indicaba riesgo para zoonosis, cuadros febriles, trombocitopenia, hepatitis, erupción petequiral, entre otros. A dicho paciente se le diagnosticó la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* por medio de serología y se trató respectivamente, además se tuvo en cuenta el contacto con aguas estancadas, consumo de estas en malas condiciones e interacción con animales tanto domésticos como silvestres (23). Por otro lado se realizó un estudio en el departamento de Sucre, en este se tuvieron en cuenta 90 muestras recolectadas entre ordeñadores, jornaleros, profesionales del campo y otras personas que laboraban en diferentes actividades rurales. Dicho estudio logró identificar qué de las 90 muestras, 12 fueron positivas para *Leptospira sp.*, siete para *Rickettsia sp.*, y 3 para *Ehrlichia sp.* (24).

El tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, pues al ser una especie silvestre, resulta complicado la obtención de los permisos pertinentes para poder obtener dichas muestras. No obstante, cabe denotar que la captura de estos animales requiere permisos especiales de las autoridades competentes, en ese caso solo se pudieron obtener las muestras mencionadas anteriormente, aunque los permisos de colecta se encuentran en trámite, pero requieren una logística importante para la captura de individuos. La difícil obtención de cualquier material perteneciente a animales silvestres resulta bastante complejo teniendo en cuenta que sus estudios son de gran importancia para la conservación de los ecosistemas, por tal motivo, se plantea la idea de crear un banco de ADN el cual permita seguir realizando estudios de análisis de poblaciones en un futuro.

Conclusiones

Para concluir, resulta importante tener en cuenta que la prueba Elisa puede detectar la presencia de anticuerpos para cinco parásitos distintos, por otro lado, se debe apreciar que el estadio de la enfermedad en el animal es indispensable a la hora de identificar su presencia en el organismo, pues estudios aseguran que 18 días y 3 años después se puede desconocer la presencia de la enfermedad en un paciente que la presentó. Finalmente es importante tener en cuenta el número de muestras,

pues resulta complicado la obtención de las mismas, siendo estas indispensables para el desarrollo de este tipo de estudios, así mismo, hay que considerar el proceso de estandarización de la prueba PCR, pues este resulta ser un proceso complejo y de gran responsabilidad.

Recomendaciones

Se recomienda la realización de más estudios relacionados con la identificación de diferentes patógenos en animales silvestres, que se pueden ver involucrados en la transmisión de enfermedades del medio silvestre al doméstico y viceversa. Además la realización y enriquecimiento de un banco de ADN que permita la elaboración de posteriores estudios en las diferentes especies, especialmente en el zorro-perro (*Cerdocyon thous*).

Bibliografía

1. Tania.S M. Distribución y uso de hábitat del perro (. Pontificia Universidad Javeriana; 2015.
2. A LB, E OL, A FS, S AM, S LH. Evidencia hematológica y serológica de Ehrlichia spp en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en lima metropolitana. 2013;24(1):64–71.
3. Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW. Susceptibility of Red and Gray Foxes To Infection By Ehrlichia Chaffeensis. J Wildl Dis [Internet]. 1999;35(4):696–702. Available from: <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-35.4.696>
4. Importancia de los animales silvestres [Internet]. Available from: <http://ambientebogota.gov.co/web/fauna-silvestre/importancia>
5. Loveridge A., Nel JAJ. Black-backed jackal. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. 2004. 1-443 p.
6. Almeida AP, Souza TD, Marcili A, Labruna MB. Novel Ehrlichia and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (Cerdocyon thous) in

- southeastern Brazil. J Med Entomol [Internet]. 2013;50(3):640–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802461>
7. Tchaicka L, Eizirik E, De Oliveira TG, Candido JF, Freitas TRO. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). Mol Ecol [Internet]. 2007 Dec 5;16(4):819–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2006.03185.x>
 8. Baptiste MP, Castaño N, Lasso C a., Cárdenas D, Gutiérrez FDP, Gil DL. Análisis de riesgo y propuesta de categorización de especies introducidas para Colombia [Internet]. Bogotá, DC, Colombia. 2010. 200 p. Available from: <http://www.acictios.org/publi/1.pdf>
 9. Hughes J, Macdonald DW. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. Biol Conserv [Internet]. 2013;157:341–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.005>
 10. Butler JRA, Du Toit JT, Bingham J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: Threats of competition and disease to large wild carnivores. Biol Conserv. 2004;115(3):369–78.
 11. Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LM a, Labruna MB. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. J Med Entomol. 2007;44(1):126–32.
 12. Scorpio DG, Wachtman LM, Tunin RS, Barat NC, Garyu JW, Dumler JS. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2008;47(5):23–8.
 13. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. Vet J [Internet]. 2011;187(3):292–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
 14. Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-

- Rodriguez M, Machado RZ, et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol* [Internet]. 2012;186(3–4):254–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
15. R Core team. R Core Team [Internet]. Vol. 55, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. 2015. p. 275–86. Available from: <http://www.mendeley.com/research/r-language-environment-statistical-computing-96/%5Cnpapers2://publication/uuid/A1207DAB-22D3-4A04-82FB-D4DD5AD57C28>
 16. Vaden SL, Knoll JS, Smith Jr. FWK, Tilley LP. Blackwell's five-minute veterinary consult: laboratory tests and diagnostic procedures, canine and feline. Blackwell's five-minute Vet Consult Lab tests diagnostic Proced canine feline. 2009;4:6382.
 17. Thomson K, Yaaran T, Belshaw A, Curson L, Tisi L, Maurice S, et al. A new TaqMan method for the reliable diagnosis of *Ehrlichia* spp. in canine whole blood. 2018;1–7.
 18. Gieg J, Rikihisa Y, Wellman M. Diagnosis of *Ehrlichia ewingii* infection by PCR in a puppy from Ohio. 2009;3:406–10.
 19. Cetin N, Rosenbaum R. First Reported Case of *Ehrlichia ewingii* Involving Human Bone. 2014;52(11):4102–4.
 20. Allison RW, Little SE. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. 2013;0:1–18.
 21. Fishman Z, Gonen L, Harrus S. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. 2004;119:21–6.
 22. Pusterla N, Deplazes P, Braun U, Lutz H. Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. *J Clin Microbiol*.

1999;37(4):1168–9.

23. Hidrón A, Mu F, Vega J. Asociación Colombiana de Infectología Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia. 2014;18(4):162–6.
24. Franco S, Mattar S, Urrea M, Tique V. Seroprevalencia de *Leptospira* sp ., *Rickettsia* sp . y *Ehrlichia* sp . en trabajadores rurales del departamento de Sucre , Colombia Materiales y métodos. 2008;319–24.
25. Rica C, Dolz G, Ábrego L, Romero LE, Campos-calderón L, Bouza-mora L, et al. Conferencias Magistrales Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. 2013;34–40.
26. Torres-mejía AM, Fuente J De. Risks Associated With Ectoparasites of Wild Mammals in the Department of Quindío , Colombia. :187–92.